

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2012

課題番号：23689043

研究課題名（和文） 融合型 ALK 陽性肺がんの臨床応用基盤技術開発

研究課題名（英文） Development of diagnostic technologies for ALK-positive lung cancer

研究代表者

曾田 学 (SODA MANABU)

自治医科大学・医学部・ポストドクター

研究者番号：10406118

研究成果の概要（和文）：

*EML4-ALK*ならびに *KIF5B-ALK* 融合型がん遺伝子にはいくつかの融合バリエーションが存在するが、我々はこれら融合型 ALK キナーゼの全てのバリエーションを検出する multiplex RT-PCR 法を開発して、ALK 肺がん研究会における前向き診断スクリーニングプロジェクトを行った。その結果 754 例の肺がん症例中 32 例が *EML4-ALK* 陽性であることが確認され、新規融合バリエーションも存在する事が明らかになった。我々が開発した multiplex RT-PCR 法は実臨床においても *EML4-ALK/KIF5B-ALK* を正確に診断可能な分子診断法として用いることができると言える。

研究成果の概要（英文）：

*EML4-ALK* and *KIF5B-ALK* lung cancer oncogenes have various fusion variants. We thus developed a multiplex RT-PCR system to capture all possible in-frame fusions for these oncogenes, and conducted a large-scale, prospective screening for Japanese cohort of the ALK-Lung Cancer Study Group. Examination of such specimens with RT-PCR detected 32 cases positive for *EML4-ALK* from a total of 754 individuals with lung cancer. We further detected a novel variant of *EML4-ALK* cDNA. These data confirm the clinical utility of multiplex RT-PCR system in the diagnosis of lung cancer harboring *EML4-ALK/KIF5B-ALK*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2012年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
年度			
総計	11,400,000	3,420,000	14,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：*EML4-ALK*、肺がん、multiplex RT-PCR 法

## 1. 研究開始当初の背景

肺がんは我が国及び欧米先進国におけるがん死数の第一位を占める予後不良の疾患であり、世界中で毎年 130 万人が、また日本だけでも年間 6 万人以上が肺がんのために亡くなっている。旧来の抗がん剤による化学療法の有効性は十分とは言えず、新たな治療法が期待されている中、2004 年に主にアジア人の若年非喫煙者に発症する肺がんの 2~4 割において上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異が認められ、これら肺がんに対して EGFR の特異的酵素活性阻害剤である gefitinib/erlotinib (商品名イレッサ/タルセバ) が著効を示すことが報告された。

我々は EGFR 遺伝子変異のように直接的に肺がんの原因となっているがん遺伝子を同定することを目的に、レトロウィルスライブラリーを用いた独自の cDNA 機能スクリーニング法を開発し、これを用いて喫煙歴を持つ肺腺がん切除検体を解析した結果、微小管結合タンパクをコードする EML4 遺伝子と受容体型チロシンキナーゼをコードする ALK 遺伝子とが融合した新しいがん遺伝子 EML4-ALK を発見することに成功した (申請者ら *Nature* 448:561, 2007)。本融合の結果、ALK のキナーゼドメインが EML4 タンパクのアミノ末端側とつながり、キナーゼ活性が上昇した融合型チロシンキナーゼが産生されるのである。

さらに EML4-ALK を肺胞上皮特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成したところ同マウスは速やかに多発肺腺がんを発症した。しかも同マウスに特異的 ALK 酵素活性阻害剤を投与したところ、速やかに肺がんは消失した。以上より EML4-ALK 陽性肺がんに対して ALK 活性阻害剤が有効な治療薬となることが *in vivo* において証明さ

れたのである (申請者ら *PNAS* 105:19893, 2008)。

我々の発見をうけて、多くの製薬会社が ALK 阻害剤の開発を開始しており、中でも一社は既に米国・韓国・オーストラリアにおける第一相・第二相臨床試験を終了した。その結果は 2010 年の *NEJM* 誌に発表されたが、ALK 阻害剤 (crizotinib) 単剤治療による腫瘍コントロール率が 90%で、完全寛解症例も含まれるという驚くべき治療効果であった (Kwak *et al.*, *N Engl J Med* 363:1693, 2010)。この crizotinib による第三相臨床試験は日本においても開始され、また別の製薬会社の ALK 阻害剤による第一相臨床試験も 2010 年 9 月から我が国で開始された。

## 2. 研究の目的

チロシンキナーゼの活性阻害剤である ALK 阻害剤は、活性型 ALK キナーゼを有する症例にしかその効果は認められない。したがって ALK 阻害剤が適切に臨床応用されるためには融合型 ALK 陽性肺がんを正確かつ感度良く検出する診断法の開発・確立が極めて重要となる。そこで我々は、我が国の融合型 ALK 陽性肺がん症例をボランティアで診断する all-Japan の診断ネットワーク「ALK 肺がん研究会」を 2009 年に設立し、診断活動を行ってきた。またそこで陽性となった症例に対しては、患者が希望すれば海外 (韓国ソウル大学附属病院) への治験参加をサポートすることにして診断活動を行った。

本研究プロジェクトでは、EML4-ALK および KIF5B-ALK 融合遺伝子の両者を検出する multiplex RT-PCR 法を用いた前向き検証を行い、またそれと平行してパラフィン包埋標本が得られる症例については ALK 免疫組織染色によるスクリーニングも行う。これ

らの解析結果を統合し、実際に臨床の場における融合 ALK 陽性肺がんの診断プロセスとして適切な形を提言したい。

### 3. 研究の方法

*EML4* および *ALK* 遺伝子はどちらも正常細胞の 2 番染色体短腕上に互いに反対向きに存在するため、*EML4-ALK* の融合点を挟むプライマーを用いて RT-PCR を行った場合には *EML4-ALK* 陽性がん細胞でのみ PCR 産物を生じる。したがって両遺伝子の融合点を標的とした RT-PCR 法は理論上偽陽性が存在せず、しかも PCR 法で検出できるので極めて高感度な融合型 ALK 陽性肺がんの分子診断法となる。

ただし *ALK* 側の融合点が常にエキソン 20 であるのに比し、*EML4* 側は様々な融合点が存在するため（申請者のグループら、*Cancer Res* 68:4971, *Clin Cancer Res* 14: 6618）、これら様々な in-frame fusion を全て検出することのできる multiplex RT-PCR 法を開発することが必要である。我々が別に発見した KIF5B-*ALK* 融合キナーゼを含め（*Clin Cancer Res* 15: 3143）、これら融合型 ALK キナーゼの全てのバリエーションを検出する multiplex RT-PCR を用いる。また本解析では喀痰、胸水、気管支洗浄液、切除凍結生標本など様々な臨床試料を用いた解析を行い、RT-PCR が信頼性良く使用可能なことを確認する。一方、ホルマリン処理により RNA が変性しているパラフィン包埋標本から融合型 ALK を検出するために、抗 ALK 抗体を用いた高感度免疫組織染色法も新たに開発した（*Clin Cancer Res* 15: 3143）。

そこで本計画では、現在も解析遂行中の検体を含め、ALK 肺がん研究会の診断活動における全ての multiplex RT-PCR 解析結果、

免疫組織染色法解析結果および FISH 法解析結果を統合し、それぞれの解析法による診断結果の一致率を検証し、またその精度が対象試料の種類によりどのように影響されるかを明らかにする。

### 4. 研究成果

実際に我々は 851 症例、計 916 種類の臨床検体を収集して、それぞれの検体から cDNA を調整し、内部コントロール遺伝子である RNaseP の発現を検討した。その結果、原発性非小細胞肺がん 754 例、808 種類の検体が十分な質の cDNA であることが確認された。これら検体のうち 536 検体 (66%) が気管支洗浄液や気管支擦過液などの気管支内細胞由来の細胞液が占め、次いで胸水が 103 検体 (13%)、凍結生検体が 57 検体 (7.1%)、喀痰が 35 検体 (4.3%) で他にも経気管支肺生検 (TBLB) や針生検 (TBNA) 組織や心嚢液、腹水、転移リンパ節組織など様々な種類の試料が解析された。

Multiplex RT-PCR 法による解析の結果 36 検体 (32 症例) (4.24%) が *EML4-ALK* 陽性である事が確認され、その内訳は *EML4* エキソン 13 と *ALK* エキソン 20 バリエーション (E13:A20) が 19 例、E20:A20 バリエーションが 1 例、E6a/b:A20 が 10 例、E18:A20 バリエーションが 1 例、そして新規バリエーションが 1 例であった。陽性となった 36 検体の内訳は、気管支洗浄液が 11 検体と最多で、次いで TBLB/TBNA 組織が 8 検体、切除組織が 7 検体、胸水が 5 検体、喀痰が 4 検体、転移リンパ節組織が 1 検体であった。*EML4-ALK* 陽性例は全て肺腺がんであり、腺がんの約 6% に陽性であり、50 歳以下の EGFR 遺伝子変異陰性肺腺がん症例に限定すると 28% (18/65) にまで陽性率は上昇することも明らかになった。さらに平均発症年齢は 48.3 才であり、

EML4-ALK陰性例の65.5才に比べて有意に若年発症であり ( $P < 0.001$ )、EML4-ALKは女性に好発し ( $P < 0.001$ )、非喫煙者あるいは軽度喫煙者に多いことも示された ( $P < 0.001$ )。

また陽性例14例が海外のALK阻害剤臨床試験に参加したところ奏効率は100%であった点から、正確な陽性診断が行われたことが裏付けられた。

免疫組織染色法とRT-PCR法の両方で解析可能であった検体は15例であり、そのうち2例では免疫組織染色ならびにFISH法では陰性であったが、少なくともその1例はゲノムの融合点が確認できたため、真のEML4-ALK陽性症例であったと考えられる (申請者ら *Clin Cancer Res* 18: 5682, 2012)。

以上より我々が開発したEML4-ALKならびにKIF5B-ALKを検出するmultiplex RT-PCR法は、融合型ALKキナーゼ陽性肺がん症例を感度・精度良く検出可能な分子診断法であることが証明され、良好なRNAが抽出可能な検体でさえすれば実臨床におけるALK診断法として有用であることが示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

- 1) Kawazu M, Ueno T, Kontani K, Ogita Y, Ando M, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Takeuchi K, Miki Y, Yamaguchi H, Yasuda T, Naoe T, Yamashita Y, Katada T, Choi YL, & Mano H "Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers" *PNAS*. **110**: 3029-334, 2013.
- 2) Choi YL, Soda M, Ueno T, Hamada T, Haruta H, Yamato A, Fukumura K, Ando M, Kawazu M, Yamashita Y & Mano H "Oncogenic MAP2K1 mutations in human epithelial tumors" *Carcinogenesis*. **33**: 956-961, 2012.
- 3) Kimura H, Nakajima T, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Iizasa T, Matsui Y, Yoshino M, Shingyoji M, Itakura M, Itami M, Ikebe D, Yokoi S, Kageyama H, Ohira M & Nakagawara A "ALK fusion gene positive lung cancer and 3 cases treated with an inhibitor for ALK kinase activity" *Lung Cancer*. **75**: 66-72, 2012.
- 4) Ng KP, Hillmer AM, Chuah CT, Juan WC, Ko TK, Teo AS, Ariyaratne PN, Takahashi N, Sawada K, Fei Y, Soh S, Lee WH, Huang JW, Allen JC, Jr., Woo XY, Nagarajan N, Kumar V, Thalamuthu A, Poh WT, Ang AL, Mya HT, How GF, Yang LY, Koh LP, Chowbay B, Chang CT, Nadarajan VS, Chng WJ, Than H, Lim LC, Goh YT, Zhang S, Poh D, Tan P, Seet JE, Ang MK, Chau NM, Ng QS, Tan DS, Soda M, Isobe K, Nothen MM, Wong TY, Shahab A, Ruan X, Cacheux-Rataboul V, Sung WK, Tan EH, Yatabe Y, Mano H, Soo RA, Chin TM, Lim WT, Ruan Y & Ong ST "A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer" *Nat Med*. **18**: 521-528, 2012.
- 5) Soda M, Isobe K, Inoue A, Maemondo M, Oizumi S, Fujita Y, Gemma A, Yamashita Y, Ueno T, Takeuchi K, Choi YL, Miyazawa H, Tanaka T, Hagiwara K & Mano H "A prospective PCR-based screening for the EML4-ALK oncogene in non-small cell lung cancer" *Clin Cancer Res*. **18**: 5682-5689, 2012.
- 6) Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R,

- Sakata S, Hatano S, Asaka R, Hamanaka W, Ninomiya H, Uehara H, Choi YL, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Mano H & Ishikawa Y "RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer" *Nat Med.* **18**: 378-381, 2012.
- 7) Togashi Y, Soda M, Sakata S, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Nakajima T, Mano H & Takeuchi K "KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only" *PLoS ONE* **7**: e31323, 2012.
- 8) Ueno T, Yamashita Y, Soda M, Fukumura K, Ando M, Yamato A, Kawazu M, Choi YL & Mano H "High-throughput resequencing of target-captured cDNA in cancer cells". *Cancer Sci.* **103**: 131-135, 2012.
- 9) Yamada T, Takeuchi S, Nakade J, Kita K, Nakagawa T, Nanjo S, Nakamura T, Matsumoto K, Soda M, Mano H, Uenaka T & Yano S "Paracrine Receptor Activation by Microenvironment Triggers Bypass Survival Signals and ALK Inhibitor Resistance in EML4-ALK Lung Cancer Cells" *Clin Cancer Res.* **18**: 3592-3602, 2012.
- 10) Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Okumura S, Nakagawa K, Mano H, Ishikawa Y "Pulmonary inflammatory myofibroblastic tumor expressing a novel fusion, PPFIBP1-ALK: reappraisal of anti-ALK immunohistochemistry as a tool for novel ALK-fusion identification" *Clin Cancer Res.* **17**: 3341-3348, 2011.
- 1) 日本がん分子標的治療学会第8回 TRWS、ALK 肺がんの発見から治療まで：曾田学, 2013. 1. 22：東京
- 2) 第53回日本肺癌学会総会、EML4-ALK 陽性肺がん：発見から臨床応用まで：曾田学, 2012. 11. 8:岡山
- 3) 第71回日本癌学会学術集会、Targeting ALK-fusions in lung cancer：曾田学, 2012. 9. 19:札幌
- 4) 第10回日本臨床腫瘍学会学術集会、Targeting ALK in lung cancer：曾田学, 2012. 7. 27:大阪
- 5) 第38回肺癌診断会および画像診断セミナー(招待講演)、ALK 融合型チロシンキナーゼ：肺がんの新たな分子標的：曾田学, 2012. 6. 23:新潟
- 6) 第16回日本がん分子標的治療学会学術集会、標的分子内変異による薬剤耐性：曾田学, 2011. 6-27-29:小倉
- 7) 第70回日本癌学会学術集会、Discovery of ALK mutation and its clinical application：曾田学, 2011. 10. 3:名古屋
- 8) 第9回日本臨床腫瘍学会学術集会、Discovery of ALK mutation and its clinical application：曾田学, 2011. 7. 22:横浜
- 9) 第26回日本肺癌学会ワークショップ(招待講演)、Discovery of ALK mutation and its clinical application：曾田学, 2011. 7. 16: 名古屋
- 10) 第66回呼吸器合同北陸地方会(招待講演)、ALK 融合型チロシンキナーゼを標的とした分子診断法・分子標的療法の開発：曾田学, 2011. 6. 11: 新潟
- 11) 1<sup>st</sup> Korea-Japan Joint Lung Cancer Symposium (招待講演)、Discovery of EML4-ALK oncogene: an effective target

[学会発表] (計 14 件)

- in lung cancer: Manabu Soda,  
2011.11.18: 韓国、ソウル
- 12) 9<sup>th</sup> AACR-JCA Joint Conference、Clinical application of EML4-ALK lung cancer oncogene: Manabu Soda, Kengo Takeuchi, Young Lim Choi, Toshihide Ueno, Yoshihiro Yamashita, Hiroyuki Mano.  
2013.2.21-25: アメリカ、ハワイ
- 13) 2012 COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES、Discovery of EML4-ALK fusion oncogene; an effective target in lung cancer: Manabu Soda, Toshihide Ueno, Yoshihiro Yamashita, Hiroyuki Mano. 2011.5.25: 中国、蘇州
- 14) ATS 2011 International Conference (招待講演)、Current status and role of ALK mutational testing in NSCLC: Manabu Soda, 2011.5.1: アメリカ、デンバー

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)  
なし

○取得状況 (計0件)  
なし

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

曾田 学(SODA MANABU)  
自治医科大学・医学部・ポストドクター  
研究者番号: 10406118

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし